



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1732号
学位記番号	第1229号
氏名	倉田 雅志
授与年月日	令和2年3月25日
学位論文の題名	Food-derived Compounds Apigenin and Luteolin Modulate mRNA Splicing of Introns with Weak Splice Sites (食品成分のアピゲニンとルテオリンはスプライスサイトの弱いイントロンのスプライシングを制御する) iScience, 22:336-352, 2019
論文審査担当者	主査： 岩崎 真一

【背景・目的】

口腔白板症のがん化率は3.1～16.3%とされている。食品は必ず口腔を通過することから、優れた抗腫瘍活性を示す食品成分を探索すれば口腔白板症のがん化予防に繋がり、それらを長期間口腔内に滞留させる加工を行うことで新規治療薬の開発が可能と考えられる。

真核生物において、mRNAの成熟には5'末端のRNAキャップ形成、イントロンが除去されエキソンが繋ぎ合わされるスプライシング、そして3'末端のポリアデニル化が必要であり、これらmRNA成熟過程を正常に受けたmRNAは細胞質に輸送され、タンパク質へ翻訳される。近年、mRNA成熟過程は抗がん剤の創薬ターゲットとして注目されており、実際にスプライシング阻害剤であるH3B-8800はがん細胞の増殖を強く抑制することから、既に骨髓異形成症候群や急性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病患者に対しては臨床試験が進められている。

本研究では、成熟過程が阻害されたmRNAは細胞質に輸送されず核内に留まる性質を利用し、食品由来成分からmRNAの成熟過程を阻害する化合物を探索した上で、その作用機序を明らかにすることを目的に研究を開始した。

【方法】

ヒト骨肉腫細胞株(U2OS)に食品サンプルを添加し、24時間培養後、RNA-fluorescence *in situ* hybridization (RNA-FISH)でmRNAの局在を観察し、mRNAの成熟過程を阻害する化合物を探索した。さらに食品に含まれる関連化合物を含めて、強い活性をもつ化合物を再探索した。ついで見出した候補化合物の細胞内での機能を明らかにするため、ヒト胎児腎細胞(HEK293)の核抽出液を用いて免疫沈降および質量分析を行い、標的タンパク質の機能をGene Ontology解析によって解析した。詳細に細胞内標的を明らかにするため、 β -globinレポーターアッセイや核外輸送因子のノックダウンにて解析した。候補化合物がスプライシングに影響を及ぼしていることがわかったため、全RNAを抽出してトランスクリプトームならびに選択的スプライシング解析ツールであるrMATSで解析した。解析結果を検証するため、Reverse Transcription (RT)-PCRやRT-qPCR、ウェスタンブロッティング、バイオインフォマティクス、ミニ遺伝子を用いたスプライシングアッセイなど一連の解析を行った。最後に候補化合物が腫瘍形成性細胞に与える影響をRNA-FISHやMTT試験によって非腫瘍形成性細胞と比較した。

【結果】

フラボンの一種であるアピゲニン、ルテオリン(以下、活性フラボノイドとよぶ)は、顕著にmRNAの核内蓄積を引き起こすことから、mRNA成熟阻害活性を有していることが明らかとなった。免疫沈降および質量分析、さらに β -globinレポーターアッセイや核外輸送因子のノックダウンの結果、活性フラボノイドはmRNAスプライシング因子と結合し、スプライシングに影響を与えていることが判明した。ついでトランスクリプトームとrMATSによる解析により、活性フラボノイドは代表的な選択的スプライシングパターンである、Alternative 3' splice site, Alternative 5' splice site, Mutually exclusive exons, Retained intron, Skipped exonのうち、Retained intron(イントロンがスプライシングされず残存するパターン)を高い頻度で引き起こすことがわかった。そこでアピゲニン、ルテオリンによって生じる共通のRetained intronに注目し、まずRT-PCRによって実際にRetained intronを引き起こしていることを確認した。次にRetained intronを生じたmRNAの細胞質側での発現量をRT-qPCRで解析した結果、著しく発現量が減少しており、そのタンパク質の発現量も減少していた。標的となっているイントロンの塩基配列を解析したところ、活性フラボノイドによって生じたRetained intronは短く、GC含有率が高く、5'および3'のスプライスサイトスコア(スプライシングを受けやすいかを点数化した指標)が低い傾向にあった。この結果をミニ遺伝子によって検証したところ、スプライスサイトスコアが低いイントロン(スプライスサイトの弱いイントロン)のスプライシングを阻害して核内に蓄積させていることを明らかにした。最後に、腫瘍形成性細胞と非腫瘍形成性細胞の間で、活性フラボノイドの影響の違いについて調べた。その結果、非腫瘍形成性細胞に比べて腫瘍形成性細胞に対してmRNAの核内蓄積をより強く引き起こし、かつ時間・濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示すことを観察した。

【結論】

アピゲニン、ルテオリンはmRNAスプライシング因子と結合することで、選択的スプライシングに影響すること、その中でスプライスサイトの弱いイントロンに対してretentionを惹起することを明らかにした。また、非腫瘍形成性細胞よりも腫瘍形成性細胞に対して、mRNA成熟阻害を引き起こし、細胞増殖抑制効果を示した。今後はラット白板症モデルを用いた動物実験を行い、人への応用へと展開させるべく、研究を進める予定である。

論文審査の結果の要旨

【目的】成熟過程が阻害された mRNA は細胞質に輸送されず核内に留まる性質を利用し、食品由来成分から mRNA の成熟過程を阻害する化合物を探索した上で、その作用機序を明らかにし、最終的には口腔がんへの臨床応用へと展開すること。

【方法】

ヒト骨肉腫細胞株 (U2OS) に食品サンプルを添加し、24 時間培養後、RNA-fluorescence in situ hybridization (RNA-FISH) で mRNA の局在を観察し、mRNA の成熟過程を阻害する化合物を探索した。さらに食品に含まれる関連化合物を含めて、強い活性をもつ化合物を再探索した。ついで見出した候補化合物の細胞内での機能を明らかにするため、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) の核抽出液を用いて免疫沈降および質量分析を行い、標的タンパク質の機能を Gene Ontology 解析によって解析した。詳細に細胞内標的を明らかにするため、 β -globin レポーターアッセイや核外輸送因子のノックダウンにて解析した。候補化合物がスプライシングに影響を及ぼしていることがわかったため、全 RNA を抽出してトランスクリプトームならびに選択的スプライシング解析ツールである rMATS で解析した。解析結果を検証するため、Reverse Transcription (RT) -PCR や RT-qPCR、ウェスタンブロッティング、バイオインフォマティクス、ミニ遺伝子を用いたスプライシングアッセイなど一連の解析を行った。最後に候補化合物が腫瘍形成性細胞に与える影響を RNA-FISH や MTT 試験によって非腫瘍形成性細胞と比較した。

【結果】

フラボンの一種であるアピゲニン、ルテオリン (以下、活性フラボノイドとよぶ) は、顕著に mRNA の核内蓄積を引き起こすことから、mRNA 成熟阻害活性を有していることが明らかとなった。免疫沈降および質量分析、さらに β -globin レポーターアッセイや核外輸送因子のノックダウンの結果、活性フラボノイドは mRNA スプライシング因子と結合し、スプライシングに影響を与えていることが判明した。ついでトランスクリプトームと rMATS による解析により、活性フラボノイドは代表的な選択的スプライシングパターンである、Alternative 3' splice site, Alternative 5' splice site, Mutually exclusive exons, Retained intron, Skipped exon のうち、Retained intron (イントロンがスプライシングされず残存するパターン) を高い頻度で引き起こすことがわかった。そこでアピゲニン、ルテオリンによって生じる共通の Retained intron に注目し、まず RT-PCR によって実際に Retained intron を引き起こしていることを確認した。次に Retained intron を生じた mRNA の細胞質側での発現量を RT-qPCR で解析した結果、著しく発現量が減少しており、そのタンパク質の発現量も減少していた。標的となっているイントロンの塩基配列を解析したところ、活性フラボノイドによって生じた Retained intron は短く、GC 含有率が高く、5' および 3' のスプライスサイトスコア (スプライシングを受けやすいかを点数化した指標) が低い傾向にあった。この結果をミニ遺伝子によって検証したところ、スプライスサイトスコアが低いイントロン (スプライスサイトの弱いイントロン) のスプライシングを阻害して核内に蓄積させていることを明らかにした。最後に、腫瘍形成性細胞と非腫瘍形成性細胞の間で、活性フラボノイドの影響の違いについて調べた。その結果、非腫瘍形成性細胞に比べて腫瘍形成性細胞に対して mRNA の核内蓄積をより強く引き起こし、かつ時間・濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示すことを観察した。

【結論】

アピゲニン、ルテオリンは mRNA スプライシング因子と結合することで、選択的スプライシングに影響すること、その中でスプライスサイトの弱いイントロンに対して retention を惹起することを明らかにした。また、非腫瘍形成性細胞よりも腫瘍形成性細胞に対して、mRNA 成熟阻害を引き起こし、細胞増殖抑制効果を示した。今後はラット口腔白板症モデルを用いて、人への応用へと展開させるべく、研究を進める予定である。

【審査の内容】

約 20 分のプレゼンテーションの後、第一副査の加藤教授からは 1) RNA processing の生体における意義、2) capping や polyA 付加がないと mRNA はどうなるか、3) ドッキングスタディの結果について、4) SF3B1 阻害とスプライスサイトの弱いイントロンに対するスプライシング阻害との関係について、5) スプライスサイトスコアの算出法について等、8 項目の質問がなされた。第二副査の高橋教授からは 1) 活性フラボノイドの添加濃度について、2) mRNA 成熟阻害以外による細胞死の可能性について、3) Retained intron を生じた遺伝子の機能について、4) HaCaT 細胞をコントロールとすることについて、5) スプライシング解析ツール rMATs により検出されたイベントについて等、8 項目の質問がなされた。最後に主査の岩崎教授より 1) 動物実験におけるフラボノイドの一般的な投与方法について、2) SF3B1 ノックダウンの結果について、3) 今後考えているフラボノイドの投与方法について等、3 項目の質問がなされた。これらの質問に対して概ね適切な回答が得られ、申請者は学位論文の内容を十分に理解、把握しているとともに、専攻分野に関する知識を習得しているものと判断された。本研究は、アピゲニンやルテオリンの mRNA スプライシング制御機構を明らかにし、臨床応用へと発展させるための基礎を与える重要な研究であると評価された。以上をもって本論文の筆頭著者は博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 岩崎 真一 副査 加藤 洋一、高橋 智